

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-178700

(43)公開日 平成6年(1994)6月28日

(51)Int.Cl.⁵

C12Q 1/68
1/34

識別記号

庁内整理番号

A 7823-4B
6807-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数19(全 12 頁)

(21)出願番号 特願平4-216983

(22)出願日 平成4年(1992)8月14日

(31)優先権主張番号 745153

(32)優先日 1991年8月15日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591066074

マイクロジェニクス コーポレイション
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94520,
コンコード, ビッソ レーン 2380エー

(72)発明者 スコット ジェイ. イーゼンピース

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94510,
ベニシア, カーリスル 191

(74)代理人 弁理士 青木 朗 (外4名)

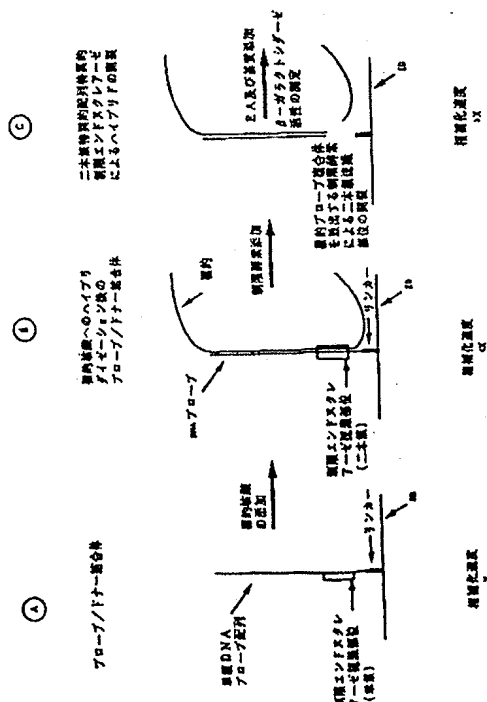
(54)【発明の名称】 相補的核酸配列の検出方法及びそのためのキット

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 酵素の相補化を利用したハイブリダイゼーション測定法の提供。

【構成】 下記のサンプル中の核酸配列の検出方法。

A. 1) 核酸含有の予想されるサンプル; 2) a) β -ガラクトシダーゼ断片を含んで成る酵素ドナーペプチド配列及びb) 前記a) に結合しており、核酸とハイブリダイズができる単鎖オリゴヌクレオチド配列を含んで成るプローブ/酵素ペプチド核合体; 3) 酵素ドナー断片との相補化に際して活性な β -ガラクトシダーゼ酵素を形成できる酵素アクセプターポリペプチド; 並びに4) 酵素の基質; を逐次的に又は同時に一緒にし; B. 核酸とオリゴヌクレオチド配列との間でハイブリダイズした配列の形成を、基質に対する酵素活性の量又は速度を測定して検出する; ことを含んで成る方法; 及び方法実施のためのキット。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中の核酸配列の検出方法であって、

A. (1) 核酸を含有すると予想されるサンプル、
(2) (a) β -ガラクトシダーゼ断片を含んで成る酵素ドナーペプチド配列、及び(b)前記(a)に結合しておりそして前記核酸とハイブリダイズすることができる単鎖オリゴヌクレオチド配列、を含んで成るプローブ/酵素ペプチド核合体；(3)前記酵素ドナー断片との相補化に際して活性な β -ガラクトシダーゼ酵素を形成

することができる酵素アクセプターポリペプチド；並びに(4) β -ガラクトシダーゼのための基質；を逐次的に又は同時に一緒にし；そして

B. 前記核酸と前記オリゴヌクレオチド配列との間のハイブリダイゼーションによるハイブリダイズした配列の形成を、前記基質に対する酵素活性の量又は速度を測定することにより検出する；ことを含んで成る方法。

【請求項2】 前記単鎖オリゴヌクレオチド配列が少なくとも1個の制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、そして前記ハイブリダイズした配列が該部位に対して特異的な少なくとも1個の二本鎖特異的制限エンドヌクレアーゼと接触する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 複数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位が存在する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記基質に対する酵素活性の量を、該基質の着色生成物である検出可能なシグナルにより測定する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記検出可能なシグナルが視覚的に検出可能なシグナルである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記着色した生成物が蛍光物質又は化学発光物質である、請求項4に記載の方法。

【請求項7】 前記の一緒にする操作に先立って前記サンプル核酸を増幅する、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記サンプル核酸をポリメラーゼ連鎖反応又は β -レプリカーゼを用いて増幅する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 前記制限エンドヌクレアーゼが固体支持体に固定化されている、請求項2に記載の方法。

【請求項10】 前記サンプル核酸がRNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記サンプル核酸がDNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 前記単鎖オリゴヌクレオチド中の前記部位が、前記単鎖オリゴヌクレオチド鎖に前記部位をあらかじめ導入した結果である、請求項2に記載の方法。

【請求項13】 前記単鎖オリゴヌクレオチドが標識に結合している、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 前記プローブ/酵素ドナーポリペプチド核合体が支持体の一端の近くに結合し、そして1又は複数の検出可能な標識の反対側の末端の近くに結合す

2

る、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 (1) (a) β -ガラクトシダーゼ断片を含んで成る酵素ドナーポリペプチド配列、及び

(b) 前記(a)に結合しており、そして核酸配列とハイブリダイズすることができる単鎖オリゴヌクレオチド配列、の結合体を含んで成る、特定の核酸配列を検出するためのプローブ/酵素ドナーポリペプチド結合体；並びに

(2) 前記(a)との相補化に際して活性な β -ガラクトシダーゼ酵素を形成することができる酵素アクセプターポリペプチド；を少なくとも1つの容器の中に含んで成るキット。

【請求項16】 場合によっては前記酵素アクセプターポリペプチドを含む、酵素基質溶液をさらに異なる容器の中に含んで成る、請求項15に記載のキット。

【請求項17】 前記単鎖オリゴヌクレオチドが少なくとも1個の制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、キットがさらに二本鎖特異的制限エンドヌクレアーゼを別の容器の中に含んで成る、請求項16に記載のキット。

【請求項18】 複数の制限エンドヌクレアーゼが存在する、請求項15に記載のキット。

【請求項19】 単鎖核酸サンプル、酵素アクセプターポリペプチド、単鎖オリゴヌクレオチド鎖及び β -ガラクトシダーゼのための基質を有する反応混合物に導入することができる固体支持体又はストリップ上に結合された請求項1のプローブ/酵素ドナーポリペプチド結合体を含んで成る、請求項15に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、核酸中の特定の相補的配列の検出方法、及び該方法において使用するための新規なキットに関する。

【0002】

【従来の技術】 核酸ハイブリダイゼーションは、遺伝物質の検出及び同定のための非常に強力な方法を提供する。ハイブリダイゼーションは、鎖中の塩基配列が相補的である場合の単鎖核酸からの二本鎖核酸の形成である。水素結合が相補鎖と一緒に保持し、そして二本鎖複合体を非常に安定にする。

【0003】 しかしながら、2個の単鎖核酸の間のハイブリダイゼーションは2個の配列の相補性に依存する。これが、核酸ハイブリダイゼーションを分析の道具として使用する場合に可能な非常に高い特異性の背後にある原理である。核酸の放射性標識又は酵素標識は、それが配列特異的ハイブリダイゼーション現象の生成をモニターしそしてそれ故に医学的に興味ある核酸配列の存在を検出することを可能にする。

【0004】 原生動物、細菌、カビ、真菌、ウィロイド、及びウイルス、又は他の任意の植物もしくは動物の生命形のゲノムからの「標的」核酸を、標識された単鎖

3

核酸「プローブ」を用いて検出しそして同定することができる。感染体に加えて、DNAプローブ法は、遺伝性疾患の存在に関連するDNA配列中の異常が存在するかどうかを決定するため又はヒトDNAを分析するために用いることができる。

【0005】これらの測定法は特定のDNA配列の存在を検出しなければならないのみならず、点変異、挿入変異又は欠失異から生ずる配列中の微細な変化を検出しなければならない。特定の配列における興味には、対立遺伝子の存在の決定、宿主ゲノムにおける病変の存在、特定のmRNAの検出、又は細胞性宿主の修飾のモニターが含まれる。

【0006】のう胞性線維症、地中海貧血、鎌形赤血球貧血、及びハンチントン病はプローブハイブリダイゼーションを用いて検出され得る遺伝的疾患の少数例である。しかしながら、感染体の存在又はヒトDNAサンプル中の異常の検出のために現在使用されている技法はめんどろであり、そして長時間を要する。

【0007】最も広く使用されている方法はサザンブロットフィルタハイブリダイゼーションとして知られている[Southern, E. J. *Mol. Biol.* 98:503(1975)]。この方法は感染体及び遺伝性疾患の検出のために広く使用されている。適切なサンプルからのDNAが制限エンドヌクレアーゼにより開裂され、そして生ずる断片がアクリルアミド又はアガロースゲル上で電気泳動的に分離される。次に、断片がニトロセルロースシートに移され、このシートが開裂された標的DNAを固定化する。

【0008】次に、シートを変性され、ラベルされたプローブとインキュベートする。このインキュベーションの間、配列特異的ハイブリダイゼーションが生ずる。感染体又は遺伝性疾患の存在を示すバンドを、過剰のラベルされたプローブを洗浄除去した後に、ニトロセルロースシートのオートラジオグラフィーにより可視化することができる。この方法は特定の核酸配列の検出において非常に鋭敏であり、そして正確であるが、実施するのにかなりの技術的専門性を必要とする。さらに、非常に時間がかかり、特殊な装置を必要とし、そして標識として放射能を使用する。

【0009】米国特許No. 4, 358, 535は、放射性標識されたプローブへの核酸のハイブリダイゼーションによる感染体の検出方法を開示している。この方法は、臨床サンプルからの遺伝子材料の抽出及びその単鎖形での固体支持体への固定を含む。次に、固定化された核酸を、注目の病原の核酸に相補的である放射能ラベルされた単鎖核酸と共にインキュベートする。

【0010】サンプル中に標的核酸が存在すれば、ハイブリダイズしないプローブを洗浄除去した後に、放射能ラベルされたプローブを固相上で検出することができる。この方法はまた、放射能を用いて行うという欠点を有する。さらに、各サンプルからの核酸を固相に固定化

4

するために多数のサンプルを扱う場合に実際的ではない。

【0011】ヨーロッパ特許出願No. 0117, 440は非放射性化学標識プローブを使用する点を除き類似する技法を開示している。ヨーロッパ特許出願No. 0070, 685は、検出のために非放射性エネルギー移行系を用いる均一ハイブリダイゼーション系を記載している。この系は、標的DNA上に相互に隣接してハイブリダイズする2本のプローブ鎖を必要とする。

【0012】2個のプローブが近接するとき、放射された光が適当な装置により測定され、そして標的核酸の存在を示す。他の関連する開示には、米国特許No. 4, 486, 539、「サンドイッチ」プローブアッセイ; Langerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981) 78:6633、核酸アフィニティープローブのためのアビジン-ビオチンの使用; 及び米国特許No. 4, 868, 104、標的の存在下でビーズの直径の増加をもたらす、第二プローブとの組合せにおけるプローブ被覆ビーズの使用、が含まれる。

【0013】上記の検討からわかるように、特定の核酸、又は核酸中の微小な変化を検出する今日の可能性は、次の因子、すなわちコスト、時間、技能、装置、安全性、感受性及びバックグラウンドシグナルの内の1つ又は複数により制限される。

【0014】固体支持体、少なくとも1つの標識、及びサンプルと標識されたプローブとを含むハイブリダイゼーションを用いる特定のヌクレオチド配列の検出方法であってデュプレックスの形成の存在又は不存在が、支持体と標識との間の空間関係を変更する能力をもたらすものは、米国特許No. 4, 775, 619に開示されている。

【0015】米国特許No. 4, 868, 105は2種類の試薬を用いる特定の核酸配列を検出するための方法及び組成物を記載しており、この場合、第一試薬が分析対象配列の標識化をもたらす、そして第二試薬が、測定媒体中の未結合標識からの分析対象に結合した標識を分離するための手段を提供する。標識の存在又は不存在を検出するために常用技法が用いられる。

【0016】支持体へのポリヌクレオチド配列の結合を必要とし、そして標識されたプローブを用いる種々のハイブリダイゼーション技法を記載する上記特許を引用によりこの明細書に組み入れる。理想的な検出系は安価であり、均一であり、発色性であり、簡単であり、そして病原体又は非病原体及び遺伝子標的に適用し得るものである。それは有害な放射能の使用を回避し、そして特定の核酸配列を検出するための鋭敏で且つ正確な系を提供するであろう。

【0017】

【発明の概要】本発明は特定の標的核酸配列の検出のための方法及び組成物を提供する。本発明は、特定の配列

5

を有する核酸の存在又は不存在を検出する能力を提供し、そしてさらに核酸配列中の微小な相違を検出する能力を提供する。これらの能力は、(a) ペプチドが発現される段階への細胞の増殖を必要としないで、且つ

(b) 遺伝子が劣性であるときに、植物又は動物細胞の存在又は不存在を含めて、病原性及び非病原性状態並びに遺伝形質の検出及び同定のために直接有用である。

【0018】特定の態様において、本発明は、単鎖DNAオリゴヌクレオチドと、 β -ガラクトシダーゼの配列の一部分を示すポリペプチド断片(ED)との結合体であるプローブを用いる。このEDポリペプチドは特定の不活性 β -ガラクトシダーゼ欠失変異蛋白質と再会合して[酵素相補化(enzyme complementation)として知られる過程]活性 β -ガラクトシダーゼを形成することができる。2個の不活性な β -ガラクトシダーゼ断片の再会合はプローブ/ED結合体への標的核酸のハイブリダイゼーションにより調節される。

【0019】標的とプローブ/ED結合体との間の配列特異的ハイブリドの形成を証明するために制限エンドヌクレアーゼを用いる追加の方法が提供される。核酸中の微小な差異を区別するために前記の方法及び組成物を用いる方法も記載される。

【0020】

【具体的な説明】本発明はサンプル中の特定の核酸配列(標的)の検出のための方法に向けられ、この方法は、
A. (1) サンプル、(2) (a) β -ガラクトシダーゼ断片を含んで成る酵素ドナーポリペプチド配列、及び
(b) 前記(a)に架橋した単鎖オリゴヌクレオチド、を含んで成る核酸プローブ/酵素ドナーポリペプチド結合体；(3) 酵素アクセプターポリペプチド(該酵素アクセプターポリペプチドは、前記酵素ドナーポリペプチド断片との相補化の際に活性な β -ガラクトシダーゼ酵素を形成することができる)；並びに(4) β -ガラクトシダーゼのための基質；を一緒にし；そして
B. 活性 β -ガラクトシダーゼと反応する前記基質の量を測定する；ことを含んで成る。

【0021】酵素アクセプターと結合するハイブリダイズしたプローブ/酵素ドナー結合体の能力は、サンプルからのハイブリダイズした核酸の追加の立体的及びクーロンの法則の寄与により影響される。サンプル核酸へのプローブ/酵素ドナー結合体へのハイブリダイゼーションによる二本鎖特異的配列の形成は、反応混合物中の基質に対する酵素活性の量を測定することにより検出され得る。

【0022】本発明は、図4のパネルA及びBに従うプローブ測定のために、又は図4のパネルCに示すようにヌクレアーゼを用いないで、使用することができる。これは、標的又はプローブの両者がRNA又はDNAであってもよいプローブ測定のすべての組合せに適用され得る。プローブがRNAでありそして標的がDNAであ

6

る場合、図4のパネルCにおける制限エンドヌクレアーゼに代えてRNase Hを用いることができる。RNase HはRNA-DNAハイブリドのRNA鎖を特異的に分解する。これは、核酸標的が存在する場合のみEDからプローブを除去する効果を有する。

【0023】本発明は酵素 β -ガラクトシダーゼの相補化に基礎を置く。相補化測定及びそこで使用するための視覚的検出法に関する多くの特許出願及び特許が本発明者の研究室から出されている。 β -ガラクトシダーゼ酵素ドナー及びアクセプターに向けられたこれらの特許及び出願は、米国特許No. 4,708,929；1985年10月22日出願の米国特許出願No. 788,370；1989年5月5日出願の米国特許出願No. 347,679；1989年9月22日出願の米国特許出願No. 410,996；及び米国を指定する国際出願として1990年5月4日出願されたPCT出願PCP/US90/02491である。これらの特許及び特許出願のすべてを引用により本明細書に組み入れる。

【0024】上記の開示中に記載したように、 β -ガラクトシダーゼ相補化系は、広範囲の分子量の分析対象のために鋭敏な免疫測定及びレセプター測定法を開発することを可能にする。これらの測定法は β -ガラクトシダーゼの相補化に基いている。「相補化」(complementation)とは、 β -ガラクトシダーゼ蛋白質の2個の個々の不活性な断片の自発的(spontaneous)再集成による十分に活性な β -ガラクトシダーゼ酵素の生成を意味する。

【0025】相補化における2個の不活性ポリペプチドの小さい方を「ドナー」(「酵素ドナー」又は「ED」とも称する)と称し、そして大きい方を「アクセプター」(「酵素アクセプター」又は「EA」とも称する)と称する。酵素ドナーは β -ガラクトシダーゼのアミノ酸配列のおよそN-末端1/10~1/20から成る。酵素アクセプターは β -ガラクトシダーゼの配列のおよそ残りの部分を代表する。

【0026】 β -ガラクトシダーゼのこれらのポリペプチド成分を、核酸の特定の配列の検出のため、均一、発色性、核酸「プローブ」測定を構成するために用いることができる。これは、単鎖核酸配列を酵素ドナーポリペプチド断片に化学的に結合させることにより達成される。この単鎖核酸配列(本明細書において「プローブ」とも称する)はサンプル中の検出が望まれる核酸の配列(「標的」とも称する)に相補的であるか、又は実質的に相補的である。

【0027】DNAのハイブリダイゼーションの技法は多くの文献に記載されており、これにはWalker及びGaasstra 編Techniques in Molecular Biology (1983) MacMillan Publishing Company, ニューヨーク, 113-135頁及び273-283頁; Maniatis ら編Molecular Cloning (1982) Cold Spring Harbor Laboratory, 309頁; E. Southern, J. Mol. Biol. (1985) 98:503; Botchan ら, Cell (1976) 9:269; Jaff

reys ら、Cell(1977)12:429が含まれる。これらの開示を引用により本明細書に組み入れる。

【0028】単鎖核酸はプローブオリゴヌクレオチド配列を作りそして単離するための既知の技法により調製することができ、これには自動ヌクレオチド間合成が含まれる。例えば、シグマ化学社 (Sigma Chemical Company) 「Biochemical Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents」 (1990)、及び Science 251:251(3/8/91) は、商業的に入手可能なプローブ及び (自動) オリゴヌクレオチド合成において使用するための試薬を記載している。

【0029】この様なプローブ配列は5' 末端に化学連結官能基を有し、これが種々の他の試薬とのカップリングを可能にする。この様な連結基の導入は当業界において知られている種々の方法により行われ、これには1990年6月12日出願の米国特許出願No. 537, 905が含まれる。連結官能基がポリマー材料である場合、ポリマー表面の活性化、並びに免疫グロブリン、糖蛋白質、サッカライド含有有機分子及びポリヌクレオチドの結合のための種々の方法が当業界において知られている。

【0030】米国特許No. 4, 419, 444, No. 4, 775, 619, No. 3, 756, 219及びNo. 3, 860, 386、並びにヨーロッパ特許出願No. 84308143. 1、及びScouten W.H.編 Solid Phase Biochemistry, Analytical and Synthetic Aspects (1983), Wiley & Sons, ニューヨーク, 779頁を参照のこと。プローブ配列の長さは標的の種類に依存し、そして当業者により容易に決定され得るであろう。限定的ではないが、プローブ配列は約15~約100のヌクレオチド、好ましくは約20~約45のヌクレオチドを含んで成る。

【0031】核酸のプローブ配列の連結官能基とEDの連結官能基とを連結する基は単なる結合 (例えば、酸基を活性化してEDのアミノ基と反応させることができる) でもよく、あるいは、約1~24個、さらに普通には約1~20個そして特に約1~6個の炭素原子と0~6個、好ましくは0~4個のヘテロ原子とから成る1個以上の原子の二官能物質であってもよい。炭素原子とは別に、鎖中のヘテロ原子は窒素、硫黄、酸素等を含むことができ、この場合、酸素はオキシ又はオキソとして存在し、窒素はアミノ又はアミドとして存在し、そして硫黄はチオ又はチオノとして存在する。

【0032】蛋白質化学においてよく知られているこの様な基の例にはジアルデヒド、例えばグルタルアルデヒド、及びジアミン、例えば1, 6-ジアミノヘキサンが含まれる。他の適当な連結材料には天然又は合成有機ポリマー、例えばポリサッカライド、スチレンポリマー、ポリアクリレート、例えばポリアクリルアミド、ヒドロキシエチルポリメタクリレート、ガラス、セラミック、

炭素、ポリ塩化ビニル、蛋白質等が含まれる。スチレンポリマーにはポリスチレン、芳香族成分含有ポリマー、及び高級芳香族化合物、例えばナフタレン、アントラセン等が含まれる。

【0033】共有結合が好ましい。核酸プローブ配列をEDに結合させるために任意の既知の特異的結合対を用いることができる。例えば、ビオチン-アビジン結合対を用いることができ、この場合、1つの員構成員がプローブに取付けられ、そして他方がEDに取付けられる。連結系として抗原-抗体相互作用を用いることもできる。例えば、小分子ジニトロフェノール (DNP) と抗-DNP抗体とである。

【0034】核酸プローブ配列上及びED上の多数の連結官能基を用いて、広範な種々の特定の単鎖核酸配列をEDに連結することができる。ほとんどの場合、連結のためにED中に存在する官能基はメルカプト基又はアミノ基であろう。EDのメルカプト基の連結のために特に興味あるのは広範囲の種類の容易に入手可能な基であり、これには活性化されたハロゲン、活性化されたオレフィン、又はメルカプトが含まれ、この場合前二者はチオエーテルを形成し、そして後者はジフルフィドを形成する。

【0035】特定の連結剤にはN-マレイミド安息香酸、 α -ブromoアセタミドシクロヘキサノ-カルボン酸、N-マレイミドコハク酸、メチルジチオ酢酸、等が含まれる。プローブ又はEDのアミノ基の連結のため、広範囲の種類の活性ハロゲン又はカルボン酸基を用いることができ、特に活性化されたカルボン酸基 (カルボン酸基はカルボジイミドにより活性化することができる)、活性エステル、例えばN-ヒドロキシサクシニミド、*o*-ニトロフェノール、*p*-ニトロフェノール等を用いることができる。

【0036】プローブのリン酸官能基の連結のため、活性化基、例えばイミダゾリドを用いることができる。結合の方法は文献中によく知られており、そして米国特許No. 3, 817, 837, No. 4, 262, 089, No. 4, 233, 401, No. 4, 220, 722、及びNo. 4, 374, 925により十分に例示される。1つの好ましい連結剤はサクシニミジル-1, 4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサノ-1-カルボキシレート (SNCC) である。

【0037】本発明において使用するED断片及びEA断片は当業界においてよく知られており、そして米国特許No. 4, 708, 929及びNo. 4, 956, 274に記載されているものを含む。これらのそれぞれの開示を引用により本明細書に組み入れる。ED断片及びEA断片はよく知られているから、ED断片及びEA断片の短い記載のみが必要である。この技法は、米国特許No. 4, 708, 929中に記載されている種々のED及びEAのすべてのために有用である。

【0038】さらに、この技法は、1991年5月15日に出願された係属中の米国特許出願No. 07/700,549に記載されている「オメガ相補化」(Omega complementation)に適用可能であり、その記載を引用により本明細書に組み入れる。ED配列は通常、 β -ガラクトシダーゼの全アミノ酸配列の約1/10~約1/20であり、通常は約60~約100アミノ酸から成る。ED配列は一般に修飾又は変異され、本発明のED結合体の調製において使用されるメルカプト又はアミノ官能基を導入するシステイン又はリジウ単位が存在が提供される。

【0039】EAの調製方法はよく知られており、そして天然変異体源からの単離を包含することができ、あるいはEAは既知組換え技法により合成することができる。プローブ/ドナー結合体が単鎖核酸標的とインキュベートされるとき、プローブ及び標的はハイブリダイズ(アニール)し、核酸の二本鎖セグメントが形成される。この場合プローブ配列と標的配列は相補的である。

【0040】ハイブリダイズしたプローブ/ドナー結合体がアクセプターと再会合する能力は、結合した標的の追加の立体的及びクローンの方法の寄与により負に影響される。相補化に対するこの効果は、結合した標的の又はそれを伴わないプローブ/ドナー結合体の相補化活性をモニターすることにより容易に見ることができる。相補化活性のこの低下が β -ガラクトシダーゼ活性の低下として反映される。

【0041】標的とプローブとのハイブリダイゼーションの後に追加の段階を加えることができる。この段階は二本鎖特異的配列特異的制限エンドヌクレアーゼ(制限エンドヌクレアーゼとも称する)の添加を含む。この段階の使用は、ポリペプチド酵素ドナーへの連結点に隣接して少なくとも1個の制限エンドヌクレアーゼ部位を有するプローブ配列を選択することを含む。

【0042】本明細書において使用する場合、「二本鎖特異的配列特異的制限エンドヌクレアーゼ」なる用語は部位特異的エンドデオキシリボヌクレアーゼ及びそのイソシゾマー(isoschizomer)を意味する。一般に、これらの物質の化学構造は確立されていないが、しかし約100種のこれらの物質が同定され、そしてそれらの使用及び反応が経験的に行われる。

【0043】本発明においては、いずれのハイブリダイズしたプローブも二本鎖核酸の形で現在存在し、そしてそのまま二本鎖特異的配列特異的制限エンドヌクレアーゼと接触され(インキュベートされ)てハイブリダイズしたプローブが放出される。プローブ/ドナー結合体は単鎖核酸配列を担持するので、ハイブリダイズしていないプローブは制限エンドヌクレアーゼによって開裂されない。しかしながら、プローブと標的とがハイブリダイズするとき、それらは二本鎖認識部位を形成し、これは制限エンドヌクレアーゼにより開裂される。その結果、

標的及びプローブがドナーペプチドから放出される。

【0044】この放出の結果、酵素相補化速度が増加する。この速度は標的-プローブ/ドナー複合体の相補化速度よりも高く、そして実際にプローブ/ドナーそれ自体の相補化速度よりも高い。この理由は、標的が制限エンドヌクレアーゼ開裂によって放出されるのみならず、結合したプローブも放出されるからである。ハイブリダイズしたプローブの立体的及びクローンの法則効果の除去が、酵素ドナーと酵素アクセプターがより効率的に相補化することを可能にする。

【0045】制限エンドヌクレアーゼ開裂が二本鎖ハイブリドの形成を証明するために役立つ。さらに、制限エンドヌクレアーゼの配列特異性のため、この第二段階が強力な「校正」機能を提供する。制限エンドヌクレアーゼは基質が二本鎖である場合のみ、そして正しい配列が認識部位に存在する場合にのみ切断を行う。1個の塩基が認識部位とマッチしない場合、酵素は切断しないであろう。この性質が、唯一の差異が1塩基変化である2つの標的配列の間を本発明が区別することを可能にする。

【0046】この能力の重要性は、本発明が遺伝子性疾患の検出に適用される場合に明らかである。例えば、鎌形赤血球貧血は β -グロビン中の第六アミノ酸に対応する単一塩基変化(GAG→GTG)により生ずる。この変異はまた、制限エンドヌクレアーゼMst IIのための認識部位を破壊する。

【0047】本発明は、正常 β -グロビン配列に正確に相補的であるプローブ配列を設計し、そして次にハイブリダイズしたプローブをMst II又はそのイソシゾマーの1つにより切断することにより正常 β -グロビンDNA配列と鎌形赤血球 β -グロビンDNA配列との間を識別するために使用することができる。プローブが正常配列標的にハイブリダイズすれば、それはMst IIにより切断されるがそれが鎌形赤血球配列標的とハイブリダイズすれば開裂されないであろう。

【0048】従って、単一塩基ミスマッチがプローブとのハイブリダイゼーションを回避するために不十分である(非常に注意深く制御された条件を除く)にも拘らず、単一塩基変化はなお制限エンドヌクレアーゼの配列特異性を用いて検出され得る。本発明はまた同様に、密接に関連した感染体の間を区別するために有用である。

【0049】本発明はまた、幾つかの核酸増幅系(米国特許No. 4,683,202及びNo. 4,683,195、ヨーロッパ特許No. 272,098及びNo. 224,126、並びにPCT特許出願87/3,451)の能力をユニークに利用することにより、増幅された標的に新規な対立遺伝子特異的制限エンドヌクレアーゼ部位を導入する(Friedmanら、*Clin.Chem.* 36:695;Hallasosら、*Nucleic Acids Res.* 17:3606)ことができる。関連する他の増幅系にはNASBA増幅系(*Nature*, 350:91)、TAS増幅系(*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 8

11

6:1173)、及び3SR増幅系(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 87:1873)が含まれる。

【0050】これらの増幅系は、増幅された標的を適切な制限エンドヌクレアーゼにより開裂せしめそして断片を電気泳動的に分離することにより正常な配列と変異した配列とを区別することを可能にする。しかしながら、前記のごとく、本発明は、均一発色方式において正常な増幅された生成物と変異した増幅された生成物との間を区別するために使用することができる。

【0051】測定方法は通常、適当な緩衝液中に試薬を含んで成る測定媒体中で行われる。緩衝液の配合は臨界的ではない。一般に、リン酸緩衝液、Tris緩衝液等を含めて任意の生理的に許容される緩衝液を使用することができる。本発明の1つの態様において、緩衝液は、約100mM〜約300mMのリン酸ナトリウム、又は約300mM〜約500mMの塩化ナトリウム、約5mM〜約15mMのEGTA又はEDTA、及び約5mM〜約20mMのナトリウムアジドを含んで成り、約6〜約8のpHを有する。

【0052】金属により触媒される酸化に対して保護するために、システイン残基を含有するポリペプチド断片にキレート剤を加えることができる。金属イオンのための安定化量のキレート剤、例えばEDTA(エチレンジアミン四酢酸)、又はEGTA(エチレングリコール四酢酸)の添加が好ましい。特に貯蔵中における細菌の増殖を防止するためにナトリウムアジドのごとき殺細菌剤が存在してもよい。

【0053】他の材料、例えば限定的ではないが酵素活性のためのマグネシウムイオン又は他のイオン、システイン残基の分解を防止するための試薬、例えばジチオスレイトール(DTT)、溶解剤、例えばエチレングリコール、及び非イオン性界面活性剤、例えばソルビトールとエチレンオキサイドとの脂肪酸縮合生成物(例えばトウイン20)、等が存在することができる。メチオニン及びウシ血清アルブミン(BSA)も存在することができる。

【0054】貯蔵安定性のある測定媒体は典型的には水性である。ED断片は通常約2pM〜約5nMの濃度で存在し、そしてEAは種々の程度に過剰に存在する。サンプルは関心あるあらゆる分離源、例えば微生物、細菌、ウイルス、ウイロイド、並びに植物及び動物の生命形態、例えば生理的流体、例えば血液、血清、血漿、脊髄液、種々の体液等から得ることができる。

【0055】サンプルが二本鎖核酸である場合、ED-プローブ結合体と混合する前に二本鎖核酸を変性するために該サンプルを処理する必要がある。変性は、サンプルを高温に暴露することにより最も容易に達成され得る。変性のための他の方法、例えばアルカリ溶液又はホルムアミドの濃厚溶液によるサンプルの処理、あるいは当業界で知られている他の方法を用いることができる。

12

サンプルは前処理にかけることができ、例えば米国特許No. 4, 556, 643に記載されているサンプル調製を行うことができ、あるいは得られたまま使用することができる。

【0056】本発明と組合わせて使用することができるサンプルの量は特に、分析対象の濃度、サンプルの種類、及び測定に感度依存する。サンプル媒体の種々の試薬及びサンプルと一緒にして反応混合物を形成した後、測定媒体を通常少なくとも0.2分間そして約15分間以下、好ましくは約1〜約10分間インキュベートする。インキュベーションの温度は通常核酸ハイブリダイゼーション反応に適合する温度範囲、例えば約40℃〜約100℃である。

【0057】次に、混合物を上昇した温度から取り出し、そして特定の制限エンドヌクレアーゼと共に、又はそれを伴わないでインキュベートする。インキュベーション条件は個々の酵素により決定される。インキュベーションの好ましい長さは15分間未満である。次に、EA及び基質を添加し、そして相補化活性を測定する。本発明の測定法は一般に、そして好ましくは大気圧において行われる。ハイブリダイゼーション又は結合のために必要な時間は核酸プローブの濃度及び配列の複雑さ、並びに測定温度、溶剤、及び試薬濃度等に依存する。

【0058】β-ガラクトシダーゼにより開裂された場合に光の吸収(光学濃度)又は放射の量の検出可能な変化をもたらす酵素基質が本発明の方法において使用される。すなわち、基質の開裂が、分光分析、化学分析又は蛍光分析のための色、化学発光又は蛍光生成物の発生又は消失をもたらす。

【0059】β-ガラクトシダーゼと共に使用するのに適当な基質には、限定的ではなく、p-アミノフェニル-β-D-ガラクトピラノシド、2'-N-(ヘキサデカノール)-N-(アミノ-4'-ニトロフェニル)-β-D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェニル-β-D-ガラクトピラノシド、ナフチル-A-S-B₁-β-D-ガラクトピラノシド、1-ナフチル-β-D-ガラクトピラノシド、2-ナフチル-β-D-ガラクトピラノシド・モノハイドレート、o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド、m-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド、p-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド、フェニル-β-D-ガラクトピラノシド、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド、レゾルフィン-β-D-ガラクトピラノシド、7-ヒドロキシ-4-トリフルオロメチルクマニン、オメガ-ニトロステリル-β-D-ガラクトピラノシド、フルオレッセイン-β-D-ガラクトピラノシド、クロロフェノールレッドガラクトシド等が含まれる。

【0060】好ましい基質はクロロフェノールレッドガラクトシド(CGRP)及びo-ニトロフェニル-β-

13

D-ガラクトシド (ONPG) である。酵素基質とのインキュベーションが基質の開裂による好ましくは色により検出され得る生成物を生成する。

【0061】他の態様において、本発明はまたこの測定方法を促進するためのキットを提供する。このキットは、(1) (a) β -ガラクトシダーゼ断片を含んで成る酵素ドナーポリペプチド配列、(b) 単鎖オリゴヌクレオチド、及び(c) 前記酵素ドナーを前記単鎖オリゴヌクレオチドに連結するための連結基、の結合体を含んで成る、特定の核酸配列を検出するためのプローブ/酵素ドナーポリペプチド結合体；並びに(2) 前記酵素ドナー断片との相補化の際に活性酵素を形成することができる酵素アクセプターポリペプチド；を少なくとも1個の容器に含んで成る。

【0062】キットはさらに、基質及び少なくとも1種の制限酵素を個別の容器中に含んで成ることができる。前記なプローブ及び方法に関してすでに上に記載した詳細及び言及がキットにもあてはまる。

【0063】特にことわらない限り、本発明において使用される試薬の相対量は、測定法の感度を実質的に最適にし得る試薬の濃度を提供するように広く変化することができる。試薬は任意の賦形剤を含む通常は凍結乾燥された乾燥粉末として提供することができ、これは溶解後に本発明の測定法を実施するために適当な濃度を有する試薬溶液を提供するものである。

【0064】

【実施例】次の実施例において使用される材料及び定義には下記のものが含まれる。

SMCC：サクシンイミジル-1, 4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサンカルボキシレート、ヘテロ二官能連結剤。

ONPG：o-ニトロフェニル- β -ガラクトシド (基質)。

ED4：ED4のコードは米国特許No. 4, 708, 929のセクション5. 1. 6に記載されている。

BP-1：図2に示す、配列番号：1。

M13mp18：図3に示す、配列番号：2。

【0065】T₂₀：20個のチミジン残基から成るホモオリゴヌクレオチド。

CPRG：クロロフェニルレッドガラクトシド (基質)。

EQTA：エチレングリコール四酢酸。

トウイーン (Tween) 20：ドデカン酸及びラウリン酸を含めての他の脂肪酸約50%並びに残りの量のミリスチン酸、パルミチン酸及びステアリン酸と、ポリオキシエチレンとソルビトールとのエーテルとの縮合生成物であるポリオキシエチレンソルビタンを示す商品名。

EA22：ED4に相補的な酵素アクセプターは米国特許No. 4, 708, 929のセクション5. 2に記載されている。

14

TEAA：トリエチルアンモニウムアセテート。

【0066】ヌクレアーゼP₁によるT₂₀の消化のための緩衝液

20mM 酢酸ナトリウム

4mM 酢酸マグネシウム

pH5. 3

EA、ED及び基質のための緩衝液

150mM リン酸ナトリウム

400mM 塩化ナトリウム

10mM EGTA

0. 05% トウイーン20

10mM メチオニン

5mg/ml ウシ血清アルブミン

pH7. 0

3mM MgCl₂

【0067】実施例1. ED-核酸結合体の調製

アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 380B DNA合成機上でホスホラミダイト法を用いて、オリゴヌクレオチドを化学合成した。各合成の最終サイクルの間、炭素原子数3個又は6個を有しそして一級アミンで終るリンカー基を、完成したヌクレオチド配列の5'末端に導入した。生成物を脱保護し、エタノール沈澱し、そしてさらに精製することなく使用した。

【0068】こうして2種類のオリゴヌクレオチドを合成した。第一は20個のチミジン残基から成るホモオリゴヌクレオチド (T₂₀) であり、そして第二は制限エンドヌクレアーゼBamHI、SmaI、KpnI及びSacIのための部位を含有する24塩基長のオリゴヌクレオチド (BP-1、配列番号：1) であった。EDペプチドへの核酸の結合を促進するため、両オリゴヌクレオチドをリンカー基の一級アミンにおいて誘導体化した。ヘテロ二官能連結基であるサクシンイミジル-1, 4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC) を10倍モル過剰に加え、そして室温にて40分間反応させた。

【0069】全長オリゴヌクレオチド鎖のみがアミンリンカーを担持するため、より短い長さの失敗した配列はSMCCと反応せず、そしてHPLCにより容易に分離される。SMCC誘導体化生成物を出発材料からC-4逆相カラム上のHPLCによってトリアンモニウムアセテート (TEAA) pH7. 0中アセトニトリルグラジエントを用いて精製した (10-30%、T₂₀；9-14%、BP-1、この配列を配列番号：1に示す)。プールされた生成物を凍結乾燥により濃縮し、そして100mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7. 0) に再溶解した。

【0070】各誘導体化されたオリゴヌクレオチドに1個のシステインスルヒドリルを含有する2倍過剰のED-4を加えた。反応を室温にて20分間行った。最終結合生成物を、逆相HPLCによりTEAA緩衝液pH7. 0中アセトニトリルグラジエントを用いて精製した (2

15

0-35%、ED4-T₂₀; 24-31%、ED4-BP-1)。ED-核酸結合体の濃度を、ED4-T₂₀及びED4-BP-1の計算された吸光係数を用いて帰属させた。

【0071】ED4-T₂₀の相補化活性

標準ED-分析対象結合体と比べたED4-T₂₀の相補化活性を決定するため、ED-4ジゴキシゲニン、ED4-ジゴキシゲニンとED4-T₂₀の両者をEA22(「EA」と称する)と相補化させ、そして得られる酵素活性を測定した。ED4-ジゴキシゲニンを力価検定し(4.25×10^{-10} - 4.25×10^{-9} mol)、そしてEA及びONPG基質の添加の後に相補化活性を420nmにおけるmAU/分として測定した。

【0072】生成物の生成速度を、ED4-ジゴキシゲニン力価検定から得られた標準曲線と比較した。この結果が示したところによれば、実質条件下でED4-T₂₀はED4-ジゴキシゲニンと同様に効率的に24%を相補する。

【0073】ED4-T₂₀のヌクレアーゼ処理による相補化活性の回復

ED4の全相補化活性がT₂₀オリゴヌクレオチドの除去により回復し得ることを示すため、種々の量のヌクレアーゼによる消化後の相補化活性をモニターするためにCOBAS BIO臨床分析機での自動測定を行った。ED4-T₂₀を20mM酢酸ナトリウム(pH5.3)、4mM酢酸マグネシウム中で種々の量のヌクレアーゼP1(Bethesda Research Laboratories)と共に37℃にて16.5分間インキュベートした。

【0074】インキュベーション期間の終に、EA及び基質CPRGを150mMリン酸ナトリウム(pH7.2)、400mM NaCl、10mM EGTA、0.05%トウイン20及び10mMメチオンin中で加えた。生成物の生成速度をmAU/分として574nmにて測定した。この結果(図1)が示すところによれば、ED4-T₂₀の相補化活性を、ヌクレアーゼによる結合体の消化により増加することができる。ヌクレアーゼ不使用条件と最高濃度制限エンドヌクレアーゼ条件との間でほとんど5倍の活性の増加が見られる。

【0075】実施例2. ED4-BP-1のヌクレアーゼ処理による相補化活性の回復

ED4-T₂₀について記載したのと同様にして、ED4-BP-1をヌクレアーゼP1処理にかけた。しかしながら、核酸鎖の完全な除去を保証するためED4-BP-1を消化するために最高量のヌクレアーゼのみを用いた。消化されたED4-BP-1及び未消化のED4-BP-1の相補化速度はそれぞれ467.93 mAU/分及び184.54 mAU/分であった。従って、核酸の除去によりおよそ2.5倍の増加が観察される。

【0076】実施例3. A₃₀₀ とのハイブリダイゼーション後のED4-T₂₀の相補化活性

16

ED4-T₂₀を300残基の平均長さのポリアデニレート鎖(A₃₀₀、シグマ)とハイブリダイズさせた。生ずるED4-T₂₀:A₃₀₀複合体の相補化活性をハイブリダイズしていないED4-T₂₀のそれと比較した。ED4-T₂₀を、60mMリン酸カリウム(pH7.0)、400mM NaCl、10mM EGTA、0.05%トウイン20、3mM MgCl₂及び10mMナトリウムアジド(殺細菌剤)中でA₃₀₀(5×10^{-8} mol)と共に又はこれを伴わないで室温にて5分間インキュベートした。

10 【0077】次に、EA及びONPGを添加し、そして吸光度の変化の速度を、30℃又は37℃にて3分間の後に420nmにて測定した。この結果が示すところによれば、ED4-T₂₀にハイブリダイズした時A₃₀₀は相補化を阻害した。ハイブリダイズした複合体のT_mは約40℃であるのでハイブリダイゼーションの程度は温度依存性である。ハイブリダイズしていないED4-T₂₀に比べて相補化は37℃にて43%阻害され、そして30℃にて60%阻害された。A₃₀₀の存在は、T₂₀と結合していないED4の相補化に影響を与えない。

20 【0078】実施例4. 標的核酸へのハイブリダイゼーションの前及び後におけるED4-BP-1の相補化活性

特定の核酸配列の相補化活性の検出のためにED-核酸結合体が有用であるか否かを決定するため、結合体をED4とBP-1とから作った。BP-1は24塩基長の単鎖DNAオリゴヌクレオチド(配列番号:1、図2)である。BP-1配列はバクテリオファージM13mp18からの単鎖DNAのマルチクローニング部位(配列番号:2、図3)に対して相補的である。約7250塩基長のウイルスDNAをモデル標的核酸として使用した。

30 【0079】 2.4×10^{-10} molのED4-BP-1複合体を 2.4×10^{-9} molのM13mp18 DNAと共に及びそれを伴わないで55℃にて10分間インキュベートした。次に、EA(20U/試験)及びCPRG(2.0mg/ml最終)を添加し、そして混合物を37℃にて4分間インキュベートした。1分間当りのA₅₇₄の増加速度を4分間と6分間との間で測定した。相補化の速度は、それぞれ標的M13mp18 DNAを用いない場合及び用いる場合でそれぞれ80.73及び47.16 mAU/分であった。従って、標的核酸とのハイブリダイゼーションにより相補化は約42%低下した(図4)。

40 【0080】実施例5. 標的結合ED4-BP-1結合体への配列特異的制限エンドヌクレアーゼの添加効果
単鎖標的M13配列(配列番号:2)とプローブBP-1配列(配列番号1)がハイブリダイズしたとき、これらは24塩基の二本鎖を形成する。この二本鎖配列には制限エンドヌクレアーゼBamHI、SmaI、KpnI及びSacIの認識部位が含まれる。

50

17

【0081】ED4-BP-1をM13mp18に35℃にて10分間ハイブリダイズさせた。次に、ハイブリダイズした複合体をBamHIと共に、及びそれを伴わないで37℃にて40分間インキュベートした。BamHIによるED4-BP-1/M13mp18複合体の開裂が完全な標的DNA及び2塩基を除くプローブDNAを放出した。

【0082】BamHIにより消化する前及び消化した後のED4-BP-1/M13mp18複合体の相補化活性を測定した。分当りのA574の増加速度を前記のようにして測定した。BamHIを加えないサンプル及び加えたサンプルについて、速度はそれぞれ47.16及び114.07であった。従って、このモデル系におけるプローブ/標的ハイブリドの開裂は相補化速度を約2.4倍増加させた(図5)。

【0083】実施例6. M13標的結合の効果及びBamHI開裂の特異性

プローブ/標的相互作用及びBamHI開裂の特異性を試験するため、幾つかの対照実験を行った。ED4-BP-1及びED4-TzoをBamHIと共に及びそれを伴わないでインキュベートした。BamHIを添加しても又はしなくても酵素相補化の差は観察されなかった。

従って、BamHIはプローブ/標的複合体の開裂につ*

配列:

GAGGATCCCC GGGTACCGAG CTCG

24

【0086】配列番号: 2

配列の長さ: 45

配列の種類: 核酸

配列:

TGATTACGAA TTCGAGCTCG GTACCCGGGG AT
CCTCTAGA GTCGA

45

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、スクレアーゼP1によるED4-Tzo結合体からのTzoへの経時的消化を示す。このモデル系が示すところによれば、核酸が酵素的に除去されるに従ってED-核酸結合体の相補化 (complementation) 活性が増加する。

【図2】図2は、M13mp18についてのプローブBP-1の単鎖DNA配列を示す。このプローブはBamHI、SmaI、KpnI及びSacIのための制限エンドヌクレアーゼ部位を示す。配列の5'末端における一級アミンリンカーがEDペプチドへのその結合を促進する。この配列を配列番号1で示す。

【図3】図3は、標的核酸M13mp18を示す。プローブBP-1に対して相補的なウイルスゲノムの配列も示される。

【図4】図4は、本発明の好ましい態様において行われ

18

*いて特異的であり、そして実験条件下で単鎖プローブDNAを開裂させない。

【0084】ED4-TzoをM13mp18標的DNAと共に及びそれを伴わないで37℃にて15分間インキュベートし、そして次に前記のようにして酵素相補活性について測定した。M13 DNAを伴う又は伴わないサンプルに差は見られなかった。これは、相補化を阻害するためにプローブと標的との間の特異性が必要であることを示した。以上本発明を十分に記載した。本発明の本質及び範囲を逸脱することなく当業者は多くの変更を行うことができる。

【0085】

【配列表1】配列番号: 1

配列の長さ: 24

配列の種類: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

鎖の型: DNA

由来:

生物: バクテリオファージ

特徴:

NAME/KEY: CDS

位置: 1...24

※鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

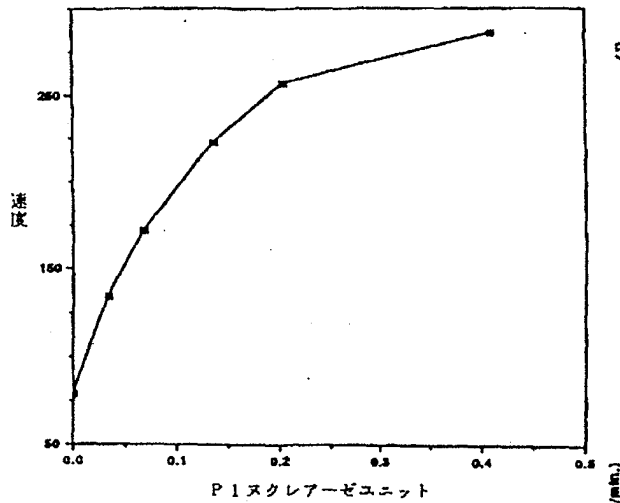
※鎖の型: DNA

る段階を示す。パネル1はEDへの結合した単鎖核酸であるED/プローブ試薬を示す。特定の制限エンドヌクレアーゼのための部位は結合点に隣接して位置する。パネルBは単鎖プローブと、自然に単鎖になっているか又はこの段階に先立って単鎖にされた標的核酸との間のハイブリダイゼーションを示す。パネルCは、二本鎖特異的制限エンドヌクレアーゼによる、二本鎖核酸ハイブリドの開裂を示す。パネルB及びCにおいて観察される相補化活性は、パネルAにおいて観察される活性よりも、それぞれ低い又は高い。

【図5】図5は、図4に記載した3つの段階、すなわち(a) ED4-BP-1結合体のみ、(b) 標的核酸にハイブリドした結合体、及び(c) 制限エンドヌクレアーゼBamHIによる開裂後の標的ハイブリド、におけるED4-BP-1結合体の相補化活性を模式的に示す。

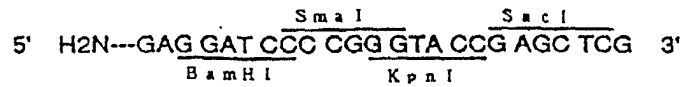
【図1】

ED4-T20及びEA22の相補化に
対するスクレーゼの効果

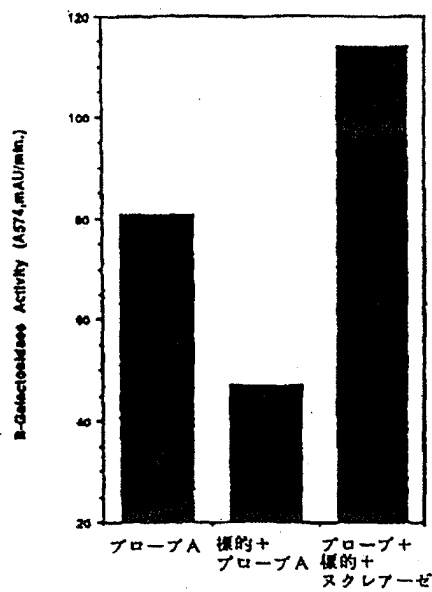


【図2】

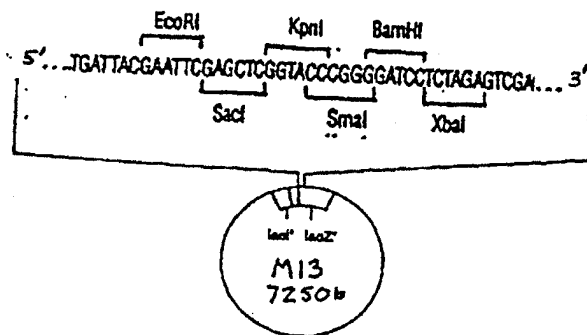
M13-mp18プロンプターP-1の配列



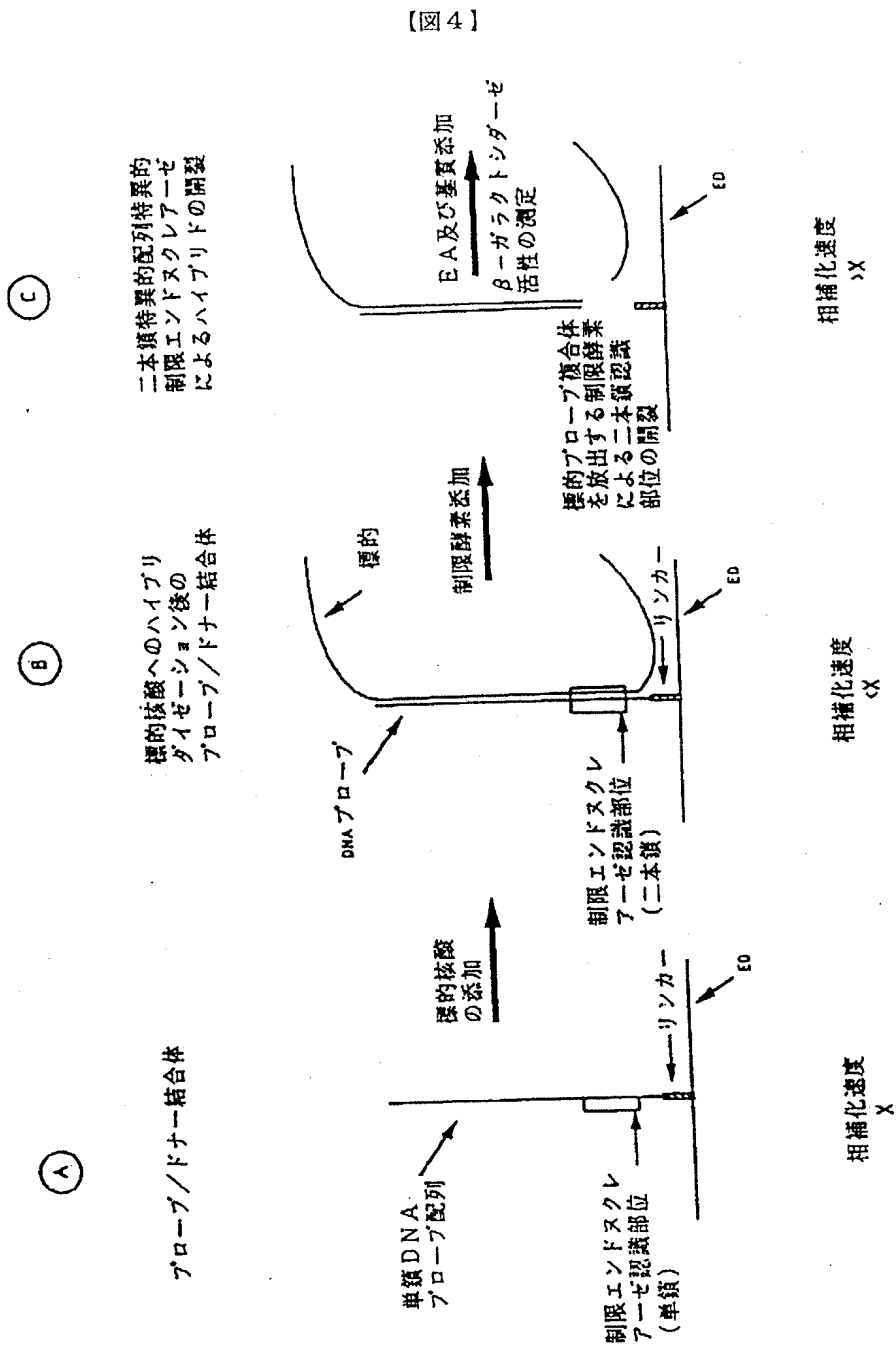
【図5】



【図3】



M13-mp18のマルチクローニング
部位の配列



【図4】